

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-229948

(43) 公開日 平成5年(1993)9月7日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/555	A D U	7252-4C		
35/74	G	7431-4C		
C 1 2 P 17/18	B	8931-4B		
// C 0 7 D 487/22		7019-4C		
(C 1 2 P 17/18				

審査請求 未請求 請求項の数4(全14頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平4-150980	(71) 出願人	000222761 東洋醸造株式会社 静岡県田方郡大仁町三福632番地の1
(22) 出願日	平成4年(1992)6月10日	(72) 発明者	鳥屋 実 静岡県田方郡大仁町三福854-1
(31) 優先権主張番号	特願平3-343670	(72) 発明者	柳沼 慧 静岡県田方郡韮山町1005-6
(32) 優先日	平3(1991)12月25日	(72) 発明者	松本 一彦 静岡県田方郡函南町上沢955-500
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(72) 発明者	松浦 一男 静岡県田方郡韮山町1005-5
		(74) 代理人	弁理士 小林 和憲

(54) 【発明の名称】 悪性腫瘍の治療剤または診断剤およびAC8007物質の製造法

(57) 【要約】 (修正有)

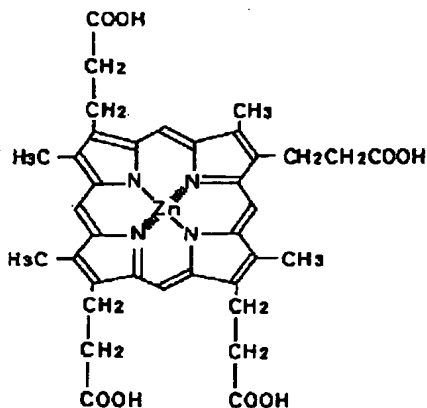
【目的】 AC8007物質またはその非毒性塩を含む悪性腫瘍の治療剤、診断剤の提供。

【構成】 以下の理化学的性質を有するAC8007物質またはその非毒性塩を含む医薬。

(1) 元素分析値: C: 約60%, H: 5%, N: 約8%, Zn: 約8~10%

(2) 質量分析値: 717 (MH⁺、FAB-MSによる)(3) 分子式: C₃₈H₃₆O₈ N₄ Zn

AC8007物質は下記推定構造式を有し、



アースロバクター属に属するAC8007物質生産菌を培地に培養し、培養物よりAC8007特質を採取することにより製造する。

15

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の理化学的性質を有するAC8007物質またはその非毒性塩を有効成分とすることを特徴とする悪性腫瘍の治療剤または診断剤。

(1) 元素分析値

C: 約60%, H: 約5%, N: 約8%, Zn: 約8~10%

(2) 質量分析値

717 (MH⁺、FAB-MSによる)

(3) 分子式

* C₃₅H₂₈O₈ N₄ Zn

(4) 可視部吸収スペクトル

【化1】

メタノール
λ_{max} nm (E 1% / 1cm):

少なくとも386 (肩) (750)、406 (3525)、538 (185)、574 (190) nm付近に特徴的な吸収を有する

【化2】

* 10

0.1NHCl・メタノール
λ_{max} nm (E 1% / 1cm):

少なくとも386 (肩) (1275)、402 (4690)、560 (175)、591 (60) nm付近に特徴的な吸収を有する

(5) 赤外線吸収スペクトル (KBr法)

少なくとも3420、2920、1705、1400、1275、1130、940、835 cm⁻¹付近に特徴的な吸収を有する

(6) 溶剤に対する溶解性

メタノール、酢酸エチル、酢酸、ジメチルスルホキシドに可溶性、水、ヘキサン、ベンゼンに不溶性

(7) 呈色反応

過マンガン酸カリウム反応、ヨード反応は陽性、塩化第二鉄反応、ドラージェンドルフ反応、ニンヒドリン反応は陰性

(8) 塩基性、酸性、中性の区別

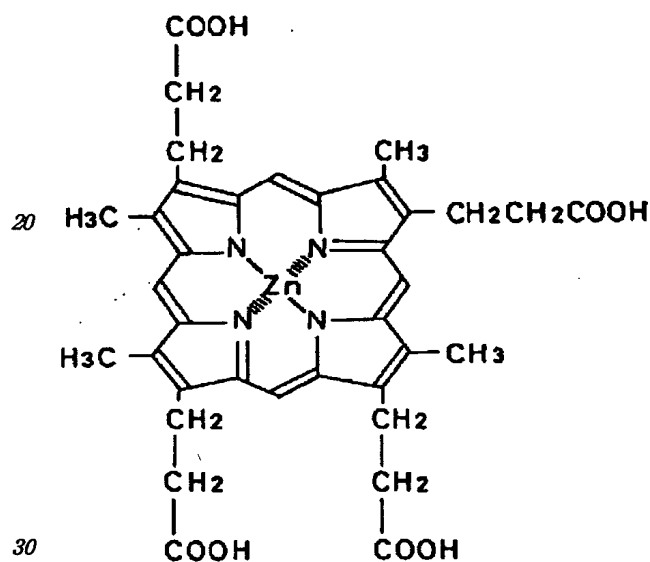
酸性物質

(9) 物質の色

暗赤色

【請求項2】 AC8007物質が下記の推定化学構造式を有することを特徴とする請求項1記載の悪性腫瘍の治療剤または診断剤。

【化3】



【請求項3】 アースロバクター属に属するAC8007物質生産菌を培地に培養し、次いで培養物よりAC8007物質を採取することを特徴とするAC8007物質の製造法。

【請求項4】 アースロバクター属に属するAC8007物質生産菌が、アースロバクター・エスピー・TM-1 (FERM BP-3676) である請求項3記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

40 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、AC8007物質またはその非毒性塩を有効成分とする悪性腫瘍の治療剤または診断剤およびAC8007物質の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】 悪性腫瘍への光化学療法 (Photodynamic therapy: PDT) が開発されて数十年を経過し、多数の有効例が確認され、早期悪性腫瘍の根治治療あるいは診断剤として使用されている。このPDTに使用される代表的増感剤はポルフィリン誘導体である。

50

【0003】しかしながら、ポルフィリン誘導体は次のような欠点がある。(1) 化学的に単一でない、(2) 組織透過性の良い長波領域に吸収を持たない、(3) 腫瘍組織に長く保持されない、(4) 正常細胞からの排泄が遅い、(5) 光化学反応量収率が低いなどがあげられる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】以上のような問題を一点でも解決できる光増感剤の開発は、将来のPDTに有効であると期待される。そして、副作用の少ない新規かつ有用な光増感剤が悪性腫瘍治療のために求められている。本発明の目的は、AC8007物質またはその非毒性塩を有効成分とする悪性腫瘍の治療剤または診断剤およびAC8007物質の製造法を提供するにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】これまでのPDTにおける光増感剤は、すべて化学的に合成された物質であり、副作用の面で問題があった。本発明者らは微生物が生産する天然の生理活性物質の内から、アースロバクター・エスピー・TM-1(微工研条寄第3676号)の培養濾液からAC8007物質(特開平2-234688号公報参照)と同定される物質を採取し、本物質が亜鉛を有する物質であることを見出した。更に、本発明者らは、本物質が悪性腫瘍のPDTの光感剤としての性質を*

*有する治療剤として、又、診断剤として有用であることを見出し、さらに、AC8007物質の良好な製造法を見出し、本発明を完成した。

【0006】本発明の有効物質であるAC8007物質は、少なくとも次に示すような理化学的性質を有する。

(1) 元素分析

C: 約60%, H: 約5%, N: 約8%, Zn: 約8~10%

(2) 質量分析 717 (MH⁺, FAB-MSによる)

(3) 分子式

C₃₈H₃₈O₈N₄Zn

(4) 可視部吸収スペクトル: 図1(中性条件)、図2(酸性条件)

【0007】

【化4】

メタノール
λ_{max} nm (E 1% / 1cm):

少なくとも386(肩)、750、406(3525)、538(185)、574(190)nm付近に特徴的な吸収を有する

【0008】

【化5】

0.1NHCl・メタノール
λ_{max} nm (E 1% / 1cm):

少なくとも386(肩)、1275、402(4690)、560(175)、591(60)nm付近に特徴的な吸収を有する。

【0009】(5) 赤外線吸収スペクトル(KBr法): 図3

少なくとも3420、2920、1705、1400、1275、1130、940、835cm⁻¹付近に特徴的な吸収を有する。

(6) 溶剤に対する溶解性

メタノール、酢酸エチル、酢酸、ジメチルスルホキシドに可溶性、水、ヘキサン、ベンゼンに不溶性

【0010】(7) 呈色反応

過マンガン酸カリウム反応、ヨード反応は陽性、塩化第二鉄反応、ドラーゲンドルフ反応、ニンヒドリン反応は陰性

(8) 塩基性、酸性、中性の区別

酸性物質

(9) 物質の色

暗赤色

(10) ¹H-NMR(400MHz、27℃、d₆-DMSO中で測定): 図4

【0011】(11) ¹³C-NMR(100MHz、27℃、DMSO中で測定): 少なくとも下記に示したシ 50

グナルが認められた。174.20(s)、147.62(s)、147.54(s)、146.83(s)、146.77(s)、146.73(s)、139.44(s)、139.30(s)、136.65(s)、136.54(s)、97.06(d)、96.95(d)、37.41(t)、21.63(t)、21.59(t)、11.46(q)

【0012】(12) 薄層クロマトグラフィー(東京化成社製、スポットフィルムシリカゲルf使用)

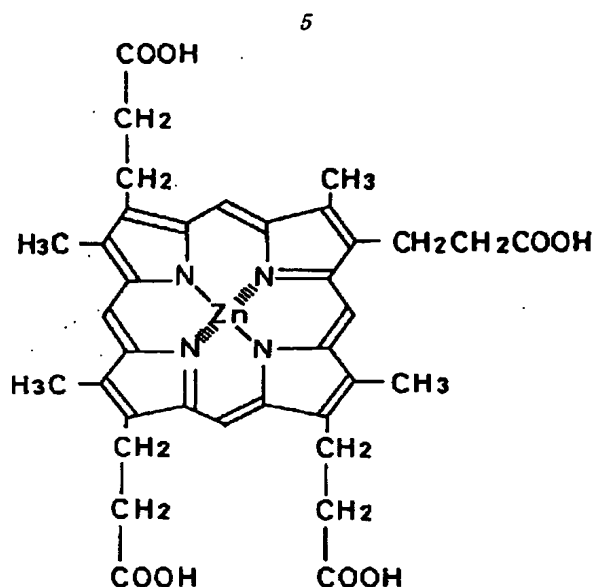
Rf=0.45[展開溶媒: クロロホルム-メタノール酢酸(10:1.5:0.1)]

Rf=0.37[展開溶媒: ブタノール-エタノール-クロロホルム-アンモニア水(4:5:2:4)]

【0013】AC8007物質は、以上の性質を有することから、次式で表される構造であると推定される。

【0014】

【化6】



【0015】本発明の有効成分であるAC8007物質を生産するには、微生物の培養による醗酵法が最も適切である。生産に好適な微生物としては、アースロバクター・エスピー TM-1 (*Arthrobacter* sp. TM-1: 微工研条寄第3676号) を挙げることができる。本菌は、滋賀県甲賀郡甲賀町の白菜畑の土壌より分離した細菌TM-1株であり、本発明に最も有効に使用される菌株の一例であって、本菌株の菌学的性質を示すと次の通りである。

【0016】尚、本菌株の同定に当たって、同定試験は「医学細菌同定の手引き、第2版、1974」や、「Microbiological Methods 3巻」等に準じて実施した。実験結果を、「医学細菌同定

5. 生理・化学的性状

グラム染色
KOH反応
抗酸性染色
カプセル形成

+

—

—

—

【0020】

OFテスト (Hugh-Leifson)
OFテスト (N源に $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)
好気での生育
嫌気での生育
生育温度 42℃
37℃
20℃
10℃

NT

O

+

+

—

+

+

NT

【0021】

食塩耐性 0%
0.5%
3.0%
5.0%
生育pH 4.7

+

+

NT

NT

—

(4)

特開平5-229948

6

の手引き、第2版、1974」「Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1 (1984), Vol. 2 (1986), Vol. 3 (1989)」等に対比して同定した。培養温度は28~30℃で行った。(+: 陽性、(+): 弱陽性、—: 陰性、NT: 未試験、ND: 文献に記載が無い、NC: 変化しない)

【0017】実験結果

1. 生育の特徴

10 普通寒天斜面培地

周辺はギザギザ状の丸い集落を形成し、中央が凸状に盛り上がる。半透明、湿潤で灰白色~淡黄土色を呈するが、可溶性色素は産生しない。

普通寒天平面培地

生育は、悪いが線状に生育する。半透明、湿潤で灰白色~淡黄土色を呈するが、可溶性色素は産生しない。

液体培地 (ペプトン水)

一様に混濁する。

リトモスミルク培地

20 アルカリになりペプトン化する。

【0018】2. DNAのGCmol %

NT

3. 主たるイソプレノイドキノン

NT

4. 形態の特徴

培養前期には長桿状を示し、彎曲し、大きさは0.8×4~5μmでV字状を示すものもある。培養後期には1.2×1.5μmの短桿状~球状に変化する細菌。

【0019】

(5)

特開平5-229948

7	8
5. 6	+
9. 0	+
10. 0	-
【0022】	
ゲラチン分解	-
デンプン分解	-
カゼイン分解	+
エスクリン分解	NT
セルロース分解	-
チロシン分解	NT
Tween 80分解	NT
アルギニン分解	NT
カタラーゼ産生	-
オキシダーゼ産生	NT
【0023】	
レシチナーゼ産生	-
ウレアーゼ産生 (SSR)	NT
ウレアーゼ産生 (Chris.)	NT
インドール産生	-
硫化水素産生 (lead acetate paper)	+
アセトイン産生 ($K_2 HPO_4$)	-
アセトイン産生 (NaCl)	-
MRテスト	-
硝酸塩還元テスト (ガス産生)	-
(NO_2^- の検出)	-
(NO_3^- の検出)	+
【0024】	
シモンズ培地での利用性 (アルカリ産生)	
クエン酸塩	-
リンゴ酸塩	+
マレイン酸塩	-
マロン酸塩	-
プロピオン酸塩	-
グルコン酸塩	(+)
コハク酸塩	+
【0025】	
クリステンゼン培地での利用性 (アルカリ産生)	
クエン酸塩	+
リンゴ酸塩	+
マレイン酸塩	+
マロン酸塩	+
プロピオン酸塩	+
グルコン酸塩	+
【0026】	
コハク酸塩	+
グルコースよりガスの産生	-
糖より酸の産生 (窒素源に $NH_4 H_2 PO_4$)	
アドニトール	-
L (+) -アラビノース	-
セロピオース	-

9	10
ズルシトール	—
メリーエリスリトール	—
フラクトース	+
【0027】	
D-ガラクトース	—
D-グルコース	+
グリセリン	+
イノシトール	—
イヌリン	—
ラクトース	—
マルトース	—
マンニトール	—
【0028】	
マンノース	—
メレジトース	—
メリピオース	—
ラフィノース	—
L (+) - ラムノース	—
D-リボース	—
サリシン	—
L-ソルボース	—
ソルビトール	—
【0029】	
スターチ	—
サッカロース	+
トレハロース	(+)
D-キシロース	+

【0030】6. その他の分析 (化学分析等)

本菌株TM-1の主性状

グラム陽性菌の細菌で短時間培養菌では桿状を示し、定常期の細胞は球状～短桿状になる。また、V、Y字形の細胞も観られる。運動性なし、カタラーゼ非産生、グルコースを酸化的に分解し、酸を産生する。

【0031】本菌株TM-1の同定

グラム陽性の細菌で桿状細胞から球状細胞に変化し、V、Y字形 (擬分岐) 等の配列を示す菌属は、Coryneform群のArthrobacter属がある。本菌株の主性状から判断しArthrobacter属に属するものと判断した (他のCoryneform群も検索したが該当する菌属の記載はなかった)。

【0032】本菌株TM-1の諸性状とArthrobacter属の各菌種の諸性状を対比した結果A. simplexが糖よりの酸産生パターンは似ているが、澱粉の分解能、カタラーゼ産生能及びリトモスミルク培地での生育の特徴が、一致しなかった。よって、本菌株をアースロバクター・エスピー TM-1 (Arthrobacter sp. TM-1) と同定命名した。本菌、アースロバクター・エスピー (Arthrobacter sp.) TM-1株は工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した (微工研条寄第3676号、FER

M BP-3676)。

【0033】本発明の有効成物AC8007物質を得るには、まず、上記の微生物またはAC8007物質を採取し得る量でAC8007物質を生産し得る能力を有する変異株又は変種を常法にしたがって培地中で好氣的に培養する。本発明で例示する培地としては、上記アースロバクター属に属するAC8007物質生産菌を、イオン交換純水1lあたり、イソプロピルアルコール10ml、酵母エキス0.3g、ペプトン3.0g、硝酸アンモニウム3.0g、リン酸カリウム0.4g、リン酸二ナトリウム1.5g、硫酸マグネシウム0.5g、硫酸マンガン10mg、硫酸亜鉛10mg、硝酸銅50μg、三酸化モリブデン10μg、炭酸カルシウム5.0gを含有する殺菌した培地100mlを収容した500ml容三角フラスコに植菌して、30℃で3日間振とう培養すればよい。この培養物を、上記同様の培地100mlを含む500ml容三角フラスコに、1ml植菌して、30℃で5日間振とう培養すればよい。

【0034】このようにして得られた培養物からAC8007物質を採取するには、AC8007物質が主に培養濾液中に存在するため、例えば培養物を濾過し、その濾過液に非水溶性有機溶媒、たとえば酢酸エチル、ブタノール、酢酸ブチルなどを加え、酸性pHにて抽出し、次

いでアルカリpHで水に転溶し、さらに酸性pHで溶媒抽出すればよい。これをさらに、シリカゲル、アルミナ、合成吸着剤などによるクロマトグラフィーに付して、分離生成するか、また、高速液体クロマトグラフィーなどを用いて分離取得することもできる。また、得られたAC8007物質は、公知の方法によりナトリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩、公知の非毒性有機アミンとの塩などの塩とすることもできる。このようにして得られたAC8007物質は、前記したような理化学的性質を有する。本発明のAC8007物質は、以下に示す作用を有する。

【0035】(1) 抗腫瘍作用

1) Sarcoma-180に対する光増感治療効果
一群5匹のICRマウス20g(雄)の背部一ケ所にsarcoma-180(1×10^8 cells/ml)を0.05ml皮内接種した。2日後にAC8007物質、ヘマトポルフィリン(HpD;シグマ社製)をそれぞれ15mgを3mlの0.1mMトリス塩酸緩衝液(pH7. *

*4)を加えた生理食塩水に溶解し、0.2mlをマウス腹腔内に投与した。

【0036】10分後にペントバルビタール麻酔を行い、さらに10分後にハロゲンランプ(JR15V150WB)を使用したルミナエースL-150S(林時計製)により光照射を10分間、腫瘍部位に熱が伝わらないように行つた。3日目から腫瘍の長径と短径を測定し、以下の式に基き計算した値を腫瘍の大きさとした。

$$\text{長い径 (mm)} \times \text{短径 (mm)}$$

$$\text{腫瘍の大きさ} = \frac{\text{長い径 (mm)} \times \text{短径 (mm)}}{2}$$

結果

AC8007物質は、50mg/kg腹腔内投与後、20分に光を照射することにより表1および図5に示すとおり著名なsarcoma-180の増殖を抑制した。

【0037】

【表1】

	腫瘍の大きさ (mm)						
	日数 (日)	3	4	5	6	7	8
対 照	非照射	20.1	26.0	35.6	48.3	56.3	52.9
	照射	21.5	27.0	36.0	48.0	58.2	58.1
AC8007物質 50mg/kg	非照射	21.1	28.2	38.1	46.6	57.6	58.1
	照射	21.3	10.6	14.6	17.3	23.9	23.7
ヘマトポルフィ リン50mg/kg	非照射	21.0	26.6	37.1	45.6	53.0	53.0
	照射	20.6	17.6	23.3	31.9	60.0	45.5

【0038】2) Sarcoma-180に対する作用
上記1)と同様の方法で、ICRマウスを1群3匹使用した。AC8007物質、ヘマトポルフィリンジハイドロクロライド(NO. H-1875、純度約75%、シグマ社製)、ヘマトポルフィリン(NO. H-5518、純度約50%、シグマ社製)を、それぞれ25mg/kg、12.5mg/kg、6.3mg/kgとなるよう5mg/2

トリス塩酸緩衝液(pH7.4)を加えた生理食塩水で調製した。この混合溶液0.2mlをマウスの腹腔内に投与し、治療効果を検べた。結果は、表2および図6に示すとおりで、AC8007物質は、対照薬として使用したヘマトポルフィリンおよびヘマトポルフィリン2・HClよりも効果が優れていることが確認された。

【0039】

【表2】

いでアルカリpHで水に転溶し、さらに酸性pHで溶媒抽出すればよい。これをさらに、シリカゲル、アルミナ、合成吸着剤などによるクロマトグラフィーに付して、分離生成するか、また、高速液体クロマトグラフィーなどを用いて分離取得することもできる。また、得られたAC8007物質は、公知の方法によりナトリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩、公知の非毒性有機アミンとの塩などの塩とすることもできる。このようにして得られたAC8007物質は、前記したような理化学的性質を有する。本発明のAC8007物質は、以下に示す作用を有する。

【0035】(1) 抗腫瘍作用

1) Sarcoma-180に対する光増感治療効果
一群5匹のICRマウス20g(雄)の背部一ヶ所にsarcoma-180(1×10^8 cells/ml)を0.05ml皮内接種した。2日後にAC8007物質、ヘマトポルフィリン(HpD;シグマ社製)をそれぞれ15mgを3mlの0.1mMトリス塩酸緩衝液(pH7. *

*4)を加えた生理食塩水に溶解し、0.2mlをマウス腹腔内に投与した。

【0036】10分後にペントバルビタール麻酔を行い、さらに10分後にハロゲンランプ(JR15V150WB)を使用したルミナエースL-150S(林時計製)により光照射を10分間、腫瘍部位に熱が伝わらないように行つた。3日目から腫瘍の長径と短径を測定し、以下の式に基き計算した値を腫瘍の大きさとした。

$$\text{長い径 (mm)} \times \text{短径 (mm)}$$

$$\text{腫瘍の大きさ} = \frac{\text{長い径 (mm)} \times \text{短径 (mm)}}{2}$$

結果

AC8007物質は、50mg/kg腹腔内投与後、20分に光を照射することにより表1および図5に示すとおり著名なsarcoma-180の増殖を抑制した。

【0037】

【表1】

	腫 瘍 の 大 き さ (mm)						
	日数 (日)	3	4	5	6	7	8
対 照	非照射	20.1	26.0	35.6	48.3	56.3	52.9
	照射	21.5	27.0	36.0	48.0	58.2	58.1
AC8007物質 50mg/kg	非照射	21.1	28.2	38.1	46.6	57.6	58.1
	照射	21.3	10.6	14.6	17.3	23.9	23.7
ヘマトポルフイ リン50mg/kg	非照射	21.0	26.6	37.1	45.6	53.0	53.0
	照射	20.6	17.6	23.3	31.9	60.0	45.5

【0038】2) Sarcoma-180に対する作用
上記1)と同様の方法で、ICRマウスを1群3匹使用した。AC8007物質、ヘマトポルフィリンジハイドロクロライド(NO. H-1875、純度約75%、シグマ社製)、ヘマトポルフィリン(NO. H-5518、純度約50%、シグマ社製)を、それぞれ25mg/kg、12.5mg/kg、6.3mg/kgとなるよう5mg/2

40 トリス塩酸緩衝液(pH7.4)を加えた生理食塩水で調製した。この混合溶液0.2mlをマウスの腹腔内に投与し、治療効果を検べた。結果は、表2および図6に示すとおりで、AC8007物質は、対照薬として使用したヘマトポルフィリンおよびヘマトポルフィリン2・HClよりも効果が優れていることが確認された。

【0039】

【表2】

	投 与 量	腫 瘍 の 大 き さ (mm ²)				
		日 数				
	(mg/kg)	3	4	5	6	7
対 照	0	18.7	22.7	34.1	36.7	
AC8007物質	25	7.8	10.5	14.5	17.6	
	12.5	11.3	14.4	21.0	23.7	
	6.3	19.3	20.9	30.9	34.4	
ヘマトポルフイリン2HCl	25	12.0	12.8	15.3	24.2	25.1
	12.5		12.9	16.3	25.6	32.0
	6.3		17.4	24.6	35.9	35.8
ヘマトポルフイリン	25		9.7	12.5	20.8	20.0
	12.5		16.1	18.0	28.4	28.9
	6.3		18.1	20.7	39.0	36.7

【0040】(2) 腫瘍診断への応用
ICRマウスの背部一ヶ所にSarcoma-180 (1×10^8 cells/ml)を0.05ml皮内接種した。2日後にAC8007物質50mg/kg投与し、光ガイドを通じて照射すると、腫瘍は蛍光により局所決定ができる。

【0041】(3) 抗腫瘍作用
1) B-16メラノーマに対する光増感治療効果
一群3匹のBDF₁マウス20g(雄)の背部一ヶ所にB-16メラノーマ(2×10^7 cells/ml)を0.05ml皮内接種した。7日後にAC8007物質、ヘマトポルフイリン(HpD; シグマ社製)をそれぞれ50mg/kg、25mg/kg、12.5mg/kgとなるように10mg/2ml、5mg/2ml、2.5mg/2ml溶液を0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH7.4)を加えた生理食塩水に溶解し、0.2mlをマウス腹腔内に投与した。10分後にベントバルビタール麻酔を行い、さらに10分後に

ハロゲンランプ(JR15V150WB)を使用したルミナエースL-150S(林時計製)により光照射を10分間、腫瘍部位に熱が伝わらないように行った。8日目から腫瘍の長径と短径を測定し、以下の式に基き計算した値を腫瘍の大きさとした。

長径(mm) × 短径(mm)

腫瘍の大きさ = $\frac{\text{長径} \times \text{短径}}{2}$

2

【0042】結果
AC8007物質は、50mg/kg、25mg/kg腹腔内投与後、20分に光を照射することにより表3および図8に示すとおり著名なB-16メラノーマの増殖を抑制し、HpDの光照射による光増感治療は表3および図9に示した。

【0043】

【表3】

	投 与 量	腫 瘍 の 大 き さ (mm ²)					
		日 数					
	(mg/kg)	7	8	9	10	11	12
対 照	0	11.9	15.9	22.6	27.04	27.46	40.8
AC8007物質	50	11.7	6.9	13.1	14.4	18.2	20.2
	25	11.5	10.9	14.2	19.8	23.1	30.9
	12.5	11.0	12.2	17.4	21.7	28.1	32.5
HpD	50	11.3	11.10	13.3	15.0	18.0	24.9
	25	12.8	11.3	14.6	21.0	25.4	28.5
	12.5	12.1	11.2	17.3	25.2	28.9	43.3

【0044】以上のSarcoma-180、B-16メラノーマを用いた腫瘍形成マウスに対し、AC8007物質はPDTにより治療効果が認められ、ヒト肺由来悪性腫瘍A549株、ヒト大腸由来悪性腫瘍AZ521株、ヒトメラノーマG361株やヒト子宮頸部由来HeLa細胞などのヒト由来腫瘍に対しても有効であると認められる。

【0045】(3) 急性毒性

AC8007物質をマウスに400mg/kg腹腔内投与しても死亡例はみられなかった。

(4) マウス急性光毒性実験

光増感剤は生体に取り込まれ、直射日光にあたると光過敏症を引き起こす。症状は初めヒフの紅斑と痒痒で始まり、その後水腫が発生し、数日後腫脹はひくがヒフの壊死が観察される。重篤な場合、昏睡状態になり死亡する*

*例もある。

1) 実験方法

ICR(♂、22~25g)マウス(1群3匹)にAC8007、HpDをそれぞれについて100mg/kg、50mg/kgとなるように、腹腔内投与を行った。投与直後からマウスの上部からハロゲンランプ(ルミナエース、林時計(株)、JCR15V、150WB)により2時間(25~28℃温度条件に維持)照射した。この時、32000ルクスであった。その後普通飼育し、マウス体重と生死を観察した。

2) 実験結果

その結果を表4に示す。

【0046】

【表4】

群		例 数	死 亡 例		
			1日目	2日目	3日目
コントロール	照射	3	0	0	0
AC8007物質	100 mg/kg (ip) 照射	3	0	0	0
	50 mg/kg (ip) 照射	3	0	0	0
HpD	100 mg/kg (ip) 照射	3	3		
	50 mg/kg (ip) 照射	3	1	0	0

【0047】上記の表4に示す通り、AC8007物質(100mg/kg、50mg/kg)投与群では死亡例は認められなかった。HpD100mg/kg投与群では全例翌日までに死亡し、50mg/kg投与群では翌日1/3例の死亡例が認められた。体重変化については図10に示す通

りであり、AC8007物質群は無投与照射コントロール群と同じ様に体重の増加が認められた。HpD50mg/kg投与群で生き残り2/3例の体重変化は翌日、翌々日まで体重減少が認められ、72時間後に回復した。以上のように急性光毒性においてAC8007物質はHp

17

Dにくらべ高い安全性を認めた。

【0048】以上に述べたように、AC8007物質を、0.1Mトリス塩酸緩衝液を含む生理食塩水(pH7.4)に溶解し、腹腔内投与、静脈内投与、経口投与等により、本物質を投与することにより、腫瘍部位に行き渡っている期間に、光、レーザー、超音波、X線などの照射を行うものである。その結果、悪性腫瘍細胞を壊死にいたらしめ、悪性腫瘍の増殖を抑制することができる。したがって、本発明の有効物質AC8007物質の投与量としては、1日成人1人当たり1~10mg/kgであり、投与方法としては、無菌緩衝液(pH7.4付近)を加えた生理食塩水に溶解し、静脈内投与、局所投与あるいは経口投与により行う。

【0049】

【発明の効果】本発明は、AC8007物質の光増感・蛍光作用により悪性腫瘍の治療ならびに診断に有効である。

【0050】実施例 1

(1) アースロバクター・エスピー・MT-1 (FERM BP-3676) を、イオン交換純水1lあたり、イソプロピルアルコール10ml、酵母エキス0.3g、ペプトン3.0g、硝酸アンモニウム3.0g、リン酸カリウム0.4g、リン酸二ナトリウム1.5g、硫酸マグネシウム0.5g、硫酸マンガン10mg、硫酸亜鉛10mg、硫酸銅50μg、三酸化モリブデン10μg、炭酸カルシウム5.0gを含有する殺菌した培地100mlを収容した500ml容三角フラスコに接種して、30℃で3日間振とう培養した。この培養物を、上記同様の培地100mlを含む500ml容三角フラスコに、1ml接種して、30℃で5日間振とう培養した。この培養物を500ml容フラスコ200本を合わせた後、遠心分離によって除菌して培養上清約19lを得た。

【0051】(2) 上記(1)で得た培養上清液を酢酸でpHを2.0に調整後、酢酸エチル8lで有効成分を抽出した。この抽出液に水4lを加え、水層のpHをアンモニア水で9.0に調整した後、抽出操作を行った。分液した水層を約500mlにまで減圧濃縮した。濃縮液を吸着樹脂(ダイヤイオンHP-20、三菱化成社製)400mlのカラムに通した。水3lで洗浄後、水3lおよび80%アセトン水3lを用いる直線型濃度勾配により溶出を行った。最初の2lを捨て、その後、17gずつの分画を行うと、フラクションNo. 87~150に有効成分が溶出された。これらのフラクションを集めて減圧濃縮して暗赤色粉末を得た。

【0052】この粉末を予めブタノール-エタノール-クロロホルム-アンモニア水(4:5:2:3)の混合溶媒で充填したシリカゲル(メルク社製、Art 7734、350ml)のカラムにチャージし、上記と同一の混合溶媒で溶出した。最初の600mlを捨て、その後、17gずつの分画を行うと、フラクションNo. 11~4

18

0に有効成分が溶出された。これらのフラクションを集めて減圧濃縮してAC8007物質の暗赤色粉末を得た。

【0053】(3) 上記(2)で得た暗赤色粉末を、メタノール50%酢酸アンモニウム水溶液(55:45)の混合溶媒2mlに溶解し、これをオクタデシルシリカゲル(山村化学社製、YMC-GEL-ODS、662ml)のカラムにチャージし、前記と同一混合溶媒で溶出した。これを20mlずつ分画を行うとフラクションNo. 42~55に有効成分が溶出された。これらのフラクションを集めて減圧下メタノール留去した。残渣を吸着樹脂(三菱化成社製、ダイヤイオンHP-20、100ml)のカラムに通した。水1lで洗浄後、80%アセトン水で溶出した。溶出液を減圧濃縮し、残渣を酢酸エチルに溶解した。

【0054】この溶液を10mMエチレンジアミンテトラアセート水溶液(pH2)で洗浄した後、酢酸エチル層を減圧濃縮した。残渣にヘキサンを加え、析出した沈澱物をガラスフィルター上に集め、減圧乾燥して精製されたAC8007物質(遊離液)を暗赤色粉末として得た。収量159mg。

【0055】(4) 上記(3)でAC8007物質(遊離液)10mgを4Nアンモニア水1mlに溶解した後、凍結乾燥してAC8007物質のアンモニウム塩を得た。収量11mg。

【0056】実施例 2

一群3匹のICRマウス、20g、雄の背部にsarcoma-180(1×10^8 cells/ml)を0.05ml皮内に接種し、2日後にAC8007物質を腹腔内に投与した。10分後にベントバルビタール麻酔を行い、更にその後、10分後にハロゲンランプ(JCR15V150WB)を使用したルミナエースL150s(林時計製)により光照射を10分間、腫瘍部位に熱が伝わらないように行つた。腫瘍の大きさを3日目から8日目にかけて測定し、表1および表2に示すようなAC8007物質の著名な腫瘍増殖抑制作用が認められた。

【0057】実施例 3

AC8007物質を無菌生理食塩水(pH7.5付近に調整)に5mg/mlとなるよう溶解した。これを0.22μmミリポアフィルターで無菌濾過し、注射剤とした。

【図面の簡単な説明】

【図1】溶媒としてメタノールを用いたときのAC8007物質の可視部吸収スペクトルである。

【図2】溶媒として0.1NHCl・メタノールを用いたときのAC8007物質の可視部吸収スペクトルである。

【図3】AC8007物質の赤外線吸収スペクトルである。

【図4】AC8007物質のプロトン核磁気共鳴スペクトルである。

【図5】AC8007物質の光増感治療効果を示した曲線である。

【図6】AC8007物質の光増感治療効果を示した曲線である。

【図7】AC8007物質の蛍光スペクトルである。

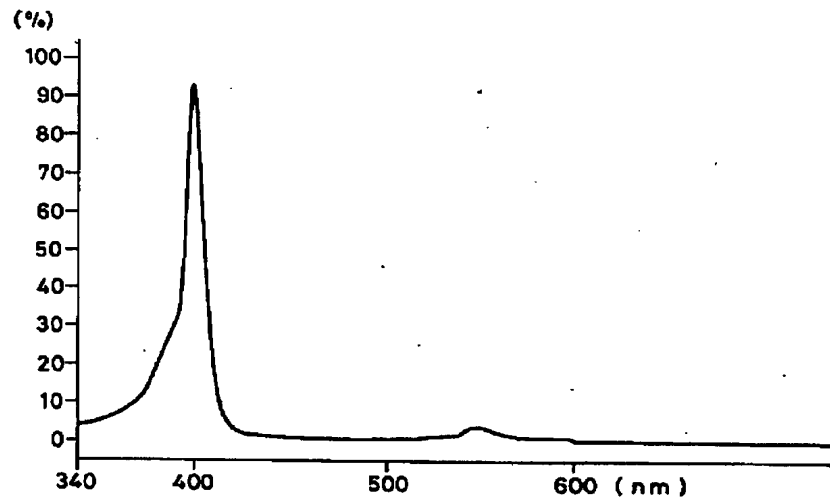
【図8】AC8007物質の光増感治療効果を示した曲線である。

線である。

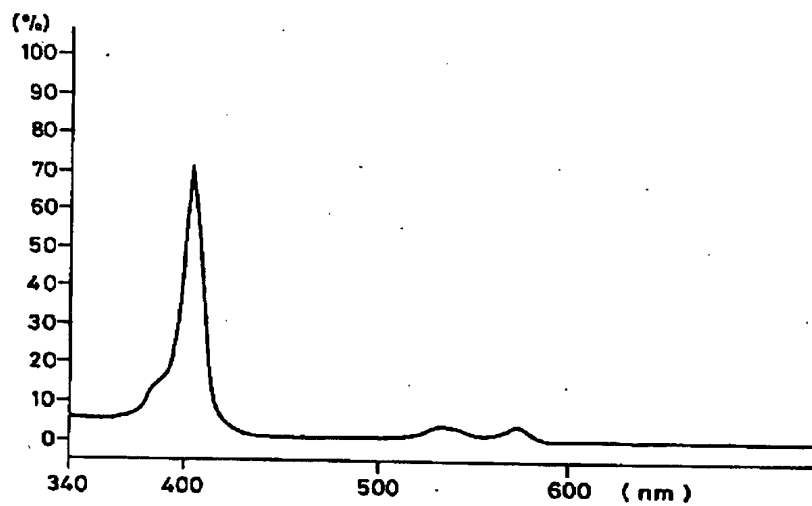
【図9】対照としてのヘマトポルフィリン(HpD)の光増感治療効果を示した曲線である。

【図10】AC8007物質およびヘマトポルフィリン(HpD)のマウス急性光毒性実験における体重変化の曲線である。

【図1】



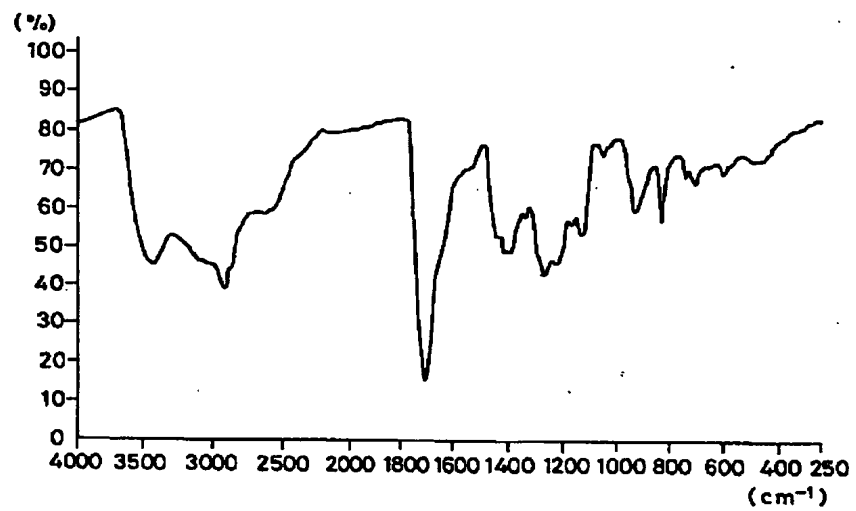
【図2】



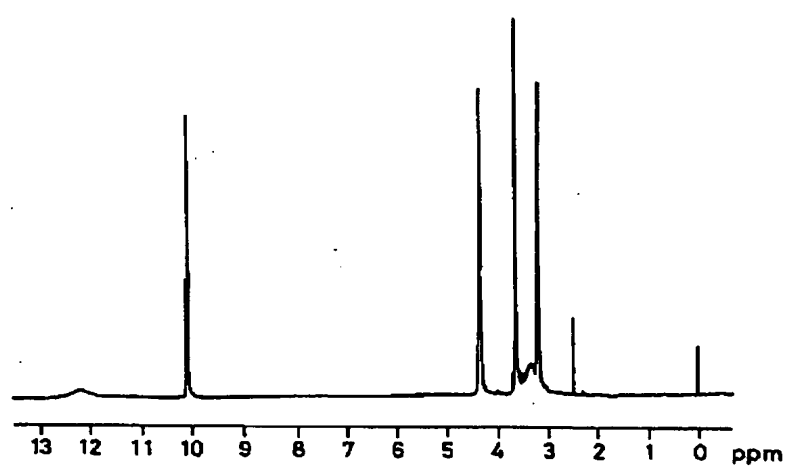
(12)

特開平5-229948

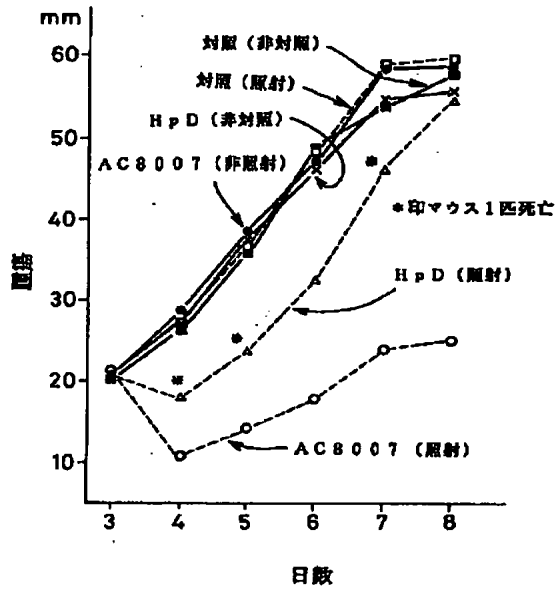
【図3】



【図4】

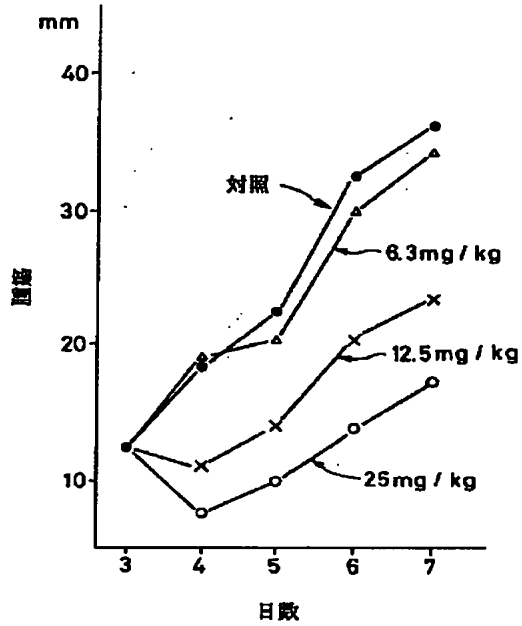


【図5】

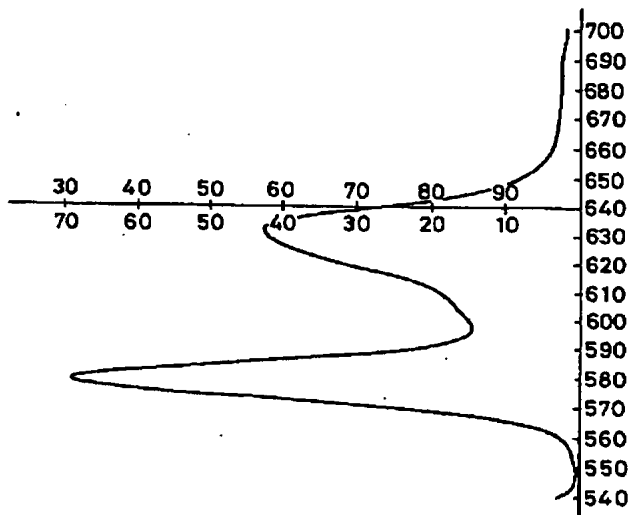


【図6】

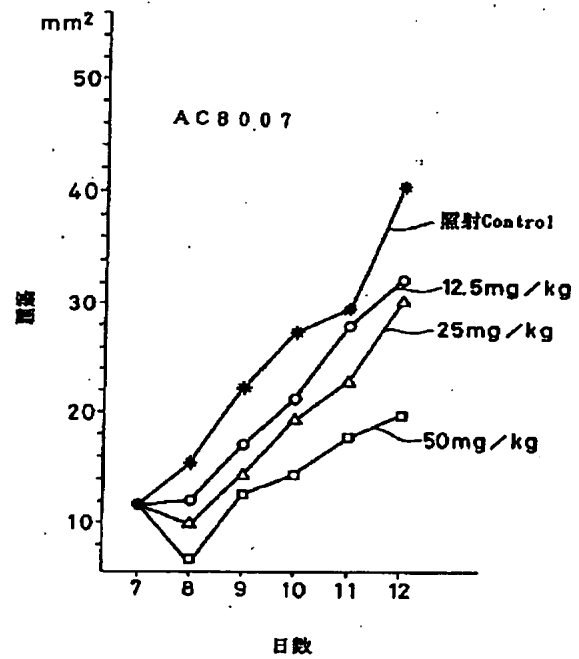
AC 8007



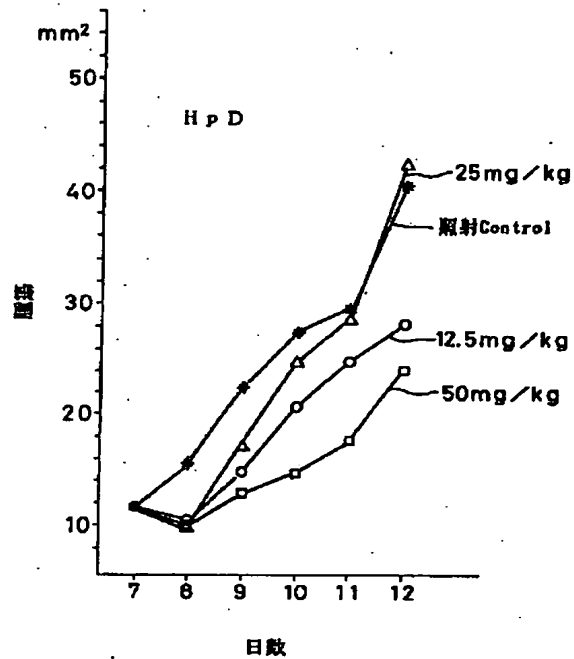
【図7】



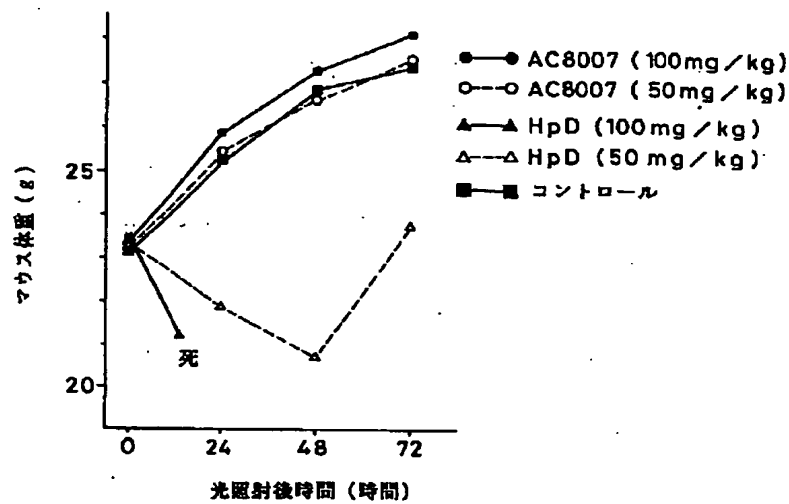
【図8】



【図9】



【図10】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵
C 1 2 R 1:06

識別記号

庁内整理番号
7804-4B

F I

技術表示箇所